

満期産脳性麻痺群の網羅的遺伝学的解析 - 17例中9例で候補遺伝子変異を同定 -

著者	竹澤 祐介
号	88
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3827号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126245

氏 名	たけざわ ゆうすけ 竹澤 祐介
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 30 年 9 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学 位 論 文 題 目	満期産脳性麻痺群の網羅的遺伝学的解析 -17 例中 9 例で候補遺伝子変異を同定-
論文審査委員	主査 教授 呉 繁夫 教授 藤原 幾磨 教授 菅原 準一

論 文 内 容 要 旨

研究背景:脳性麻痺とは、乳児期までに形成される非進行性の脳障害に起因する運動と姿勢の発達の異常を包括する概念である。脳性麻痺の頻度は 2 例/1000 出生と高く、重症例では医療経済的負担や社会的負担も大きい。脳性麻痺の原因は多様で、周産期の低酸素性脳症や新生児仮死などが主な原因として挙げられる一方、近年脳性麻痺の 14%に候補遺伝子変異、9%にコピー数異常が検出されたという報告がある。問題は、どのような特徴を持つ脳性麻痺様の症例が遺伝子・染色体に起因する可能性が高いかを示す包括的な研究は行われていないことである。今回、在胎週数と脳画像がその鍵になると仮説を立てた。まず、早期産児は満期産児に比べ、はるかに脳性麻痺の有病率が高く、環境要因による脳性麻痺症例が多いことが示唆される。満期産児を対象とすることで遺伝的要因が関わる可能性の高い群を抽出することが可能になると考えた。さらに、その症例群から脳出血や低酸素性脳症などの環境・後天的要因による症例や、脳皮質形成異常や白質脳症などの脳性麻痺と明らかに異なる症例を頭部画像により除外することで、原因診断が困難である脳性麻痺の一群に効率的な遺伝学的診断を行えると考えた。

方法: 対象症例を宮城県立こども病院の脳性麻痺 897 名のうち満期産かつ特異的な脳画像所見をもたない一群に設定した。上記対象患者群 107 家系のうち、同意と検体採取が可能であった 17 家系の DNA 検体を収集し、トリオ形式 (患者と両親) で全エクソーム解析 (次世代シーケンサーによる全エクソンの網羅的遺伝学的解析) およびマイクロアレイ CGH 解析 (微細な染色体欠失・重複を検出) を行った。スプライス部位の変異 (*CTNNB1* および *AMPD2*) については患者血液から逆転写 PCR を行うことで異常なメッセンジャー RNA の配列を確認した。また *AMPD2* ミスセンス変異については当該患者由来のリンパ芽球細胞を用いてデアミナーゼアッセイを行い、健常成人の細胞の結果と比較することで機能解析を行なった。これらの検出された遺伝子変異を米国臨床遺伝・ゲノム学会のガイドラインに沿って病的意義を評価した。

結果: 既知の疾患原因遺伝子のみで 17 名中 9 名に 8 つの遺伝子 (*CTNNB1*, *CYP2U1*, *SPAST*, *GNAO1*, *CACNA1A*, *AMPD2*, *STXBPI*, *SCN2A*) の候補変異を検出した。これは対象を選別していない脳性麻痺の既報に比べて有意 (98 例中 14 例, $p < 0.005$, Fisher's exact test) に高率であった。また、9 名中 6 名の変異遺伝子 (*CTNNB1*, *CYP2U1*, *GNAO1*, *CACNA1A*, *AMPD2*, *SCN2A*) はてんかん性脳症や痙攣性対麻痺の神経疾患原因遺伝子として報告されているが、脳性麻痺としての報告は初めてであった。スプライス部位の変異についてはいずれもスプライシング異常が起きていることが確認でき、その結果タンパクの短縮が起こることが予想された。患者由来の細胞では健常者由来の細胞と比較して *AMPD2* デアミナーゼ活性が 60%程度減少しているこ

(書式12)

とが確認された。一方で本患者群に病的変異が疑われるコピー数異常は認めなかった。

考察と今後の課題：在胎週数と頭部画像は脳性麻痺患者から遺伝疾患を抽出する為の重要な手がかりになりうることを示すことができた。脳性麻痺からの効率的な遺伝疾患の診断・分離は、個々の患者の治療、予後予測、遺伝カウンセリングに直接的に寄与できると考えられる。症例数が少ないため、本研究の知見を一般化するには今後の症例数の蓄積、および本研究の選択基準に当てはまらない脳性麻痺群の同一条件下での遺伝子変異特定率の比較が必要である。

審査結果の要旨

博士論文題目 満期産脳性麻痺群の網羅的遺伝学的解析 -17例中9例で候補遺伝子変異を同定-

所属専攻・分野名 医科学専攻・小児病態学分野

学籍番号 B5MD5075 氏名 竹澤 祐介

研究背景:脳性麻痺とは、乳児期までに形成される非進行性の脳障害に起因する運動と姿勢の発達の異常を包括する概念である。脳性麻痺の頻度は2例/1000出生と高く、重症例では医療経済的負担や社会的負担も大きい。脳性麻痺の原因は多様で、周産期の低酸素性脳症や新生児仮死などが主な原因として挙げられる一方、近年脳性麻痺の14%に候補遺伝子変異、9%にコピー数異常が検出されたという報告がある。問題は、どのような特徴を持つ脳性麻痺様の症例が遺伝子・染色体に起因する可能性が高いかを示す包括的な研究は行われていないことである。今回、在胎週数と脳画像がその鍵になると仮説を立てた。まず、早期産児は満期産児に比べ、はるかに脳性麻痺の有病率が高く、環境要因による脳性麻痺症例が多いことが示唆される。満期産児を対象とすることで遺伝的要因が関わる可能性の高い群を抽出することが可能になると考えた。さらに、その症例群から脳出血や低酸素性脳症などの環境・後天的要因による症例や、脳皮質形成異常や白質脳症などの脳性麻痺と明らかに異なる症例を頭部画像により除外することで、原因診断が困難である脳性麻痺の一群に効率的な遺伝学的診断を行えると考えた。

方法:対象症例を宮城県立こども病院の脳性麻痺897名のうち満期産かつ特異的な脳画像所見をもたない一群に設定した。上記対象患者群107家系のうち、同意と検体採取が可能であった17家系のDNA検体を収集し、トリオ形式(患者と両親)で全エクソーム解析(次世代シーケンサーによる全エクソンの網羅的遺伝学的解析)およびマイクロアレイCGH解析(微細な染色体欠失・重複を検出)を行った。スプライス部位の変異(*CTNNB1*および*AMPD2*)については患者血液から逆転写PCRを行うことで異常なメッセンジャーRNAの配列を確認した。また*AMPD2* ミスセンス変異については当該患者由来のリンパ芽球細胞を用いてデアミナーゼアッセイを行い、健常成人の細胞の結果と比較することで機能解析を行なった。これらの検出された遺伝子変異を米国臨床遺伝・ゲノム学会のガイドラインに沿って病的意義を評価した。

結果:既知の疾患原因遺伝子のみで17名中9名に8つの遺伝子(*CTNNB1*, *CYP2U1*, *SPAST*, *GNAO1*, *CACNA1A*, *AMPD2*, *STXBP1*, *SCN2A*)の候補変異を検出した。これは対象を選別していない脳性麻痺の既報に比べて有意(98例中14例, $p < 0.005$, Fisher's exact test)に高率であった。また、9名中6名の変異遺伝子(*CTNNB1*, *CYP2U1*, *GNAO1*, *CACNA1A*, *AMPD2*, *SCN2A*)はてんかん性脳症や痙攣性対麻痺の神経疾患原因遺伝子として報告されているが、脳性麻痺としての報告は初めてであった。スプライス部位の変異についてはいずれもスプライシング異常が起きていることが確認でき、その結果タンパクの短縮が起こることが予想された。患者由来の細胞では健常者由来の細胞と比較して*AMPD2* デアミナーゼ活性が60%程度減少していることが確認された。一方で本患者群に病的変異が疑われるコピー数異常は認めなかった。

考察と今後の課題:在胎週数と頭部画像は脳性麻痺患者から遺伝疾患を抽出する為の重要な手がかりになりうることを示すことができた。脳性麻痺からの効率的な遺伝疾患の診断・分離は、個々の患者の治療、予後予測、遺伝カウンセリングに直接的に寄与することができると考えられる。症例数が少ないため、本研究の知見を一般化するには今後の症例数の蓄積、および本研究の選択基準に当てはまらない脳性麻痺群の同一条件下での遺伝子変異特定率の比較が必要である。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。